

=> file wpids
COST IN U.S. DOLLARS
SINCE FILE
ENTRY TOTAL
FULL ESTIMATED COST 2.43 2.43

=> e jp 03139284/pn
E13 1 JP03139282/PN
E14 1 JP03139283/PN
E15 1 --> JP03139284/PN
E16 1 JP03139285/PN
E17 1 JP03139286/PN
E18 1 JP03139287/PN
E19 1 JP03139288/PN
E20 1 JP03139289/PN
E21 1 JP03139290/PN
E22 1 JP03139291/PN
E23 1 JP03139292/PN
E24 1 JP03139293/PN

=> s e15
L2 1 JP03139284/PN

=> d l2 ibib abs

=> log y

FILE & COST CENTER	QUANTITY @	RATE	ESTIMATED COST U.S. DOLLARS
--------------------	------------	------	--------------------------------

HOME FILE	COST=		
CONNECT HOURS		0.09 @ 15.00	1.35
WORLDCOM		0.09 @ 12.00	1.08
WPIDS FILE	COST=		
CONNECT HOURS		0.03 @ 302.00	9.06
WORLDCOM		0.03 @ 12.00	0.36
DISPLAY COMPONENT 2		2 @ 0.34	0.68
DISPLAY COMPONENT 3		2 @ 1.50	3.00
DISPLAY COMPONENT 4		2 @ 0.68	1.36
DISPLAY COMPONENT 5		2 @ 0.24	0.48

SUMMARY BY FILE	AND	COST CENTER	HOURS	ESTIMATED COST U.S. DOLLARS
-----------------	-----	-------------	-------	--------------------------------

HOME FILE		(NONE)	0.09	2.43
WPIDS FILE		(NONE)	0.03	14.94

COSTS INCLUDE TELECOMMUNICATION FEES 0.12 1.44

SUMMARY BY	COST CENTER	HOURS	ESTIMATED COST U.S. DOLLARS
	(NONE)	0.12	17.37
YOUR TOTAL SESSION COSTS ARE		0.12	17.37

L2 ANSWER 1 OF 1 WPIDS COPYRIGHT 2001 DERWENT INFORMATION LTD
ACCESSION NUMBER: 1991-218448 [30] WPIDS
DOC. NO. CPI: C1991-094886
TITLE: New gene which gives macrolide antibiotic resistance
- has DNA fragment with specified base sequence.
DERWENT CLASS: B04 D16
PATENT ASSIGNEE(S): (TOXN) TOYO JOZO KK
COUNTRY COUNT: 1
PATENT INFORMATION:

PATENT NO	KIND	DATE	WEEK	LA	PG
JP 03139284	A	19910613	(199130)*	13	<--
JP 2912423	B2	19990628	(199931)	13	

APPLICATION DETAILS:

PATENT NO	KIND	APPLICATION	DATE
JP 03139284	A	JP 1989-178490	19890711
JP 2912423	B2	JP 1990-137997	19900528

FILING DETAILS:

PATENT NO	KIND	PATENT NO
JP 2912423	B2 Previous Publ.	JP 03139284

PRIORITY APPLN. INFO: JP 1989-178490 19890711; JP 1990-137997
19900528

AN 1991-218448 [30] WPIDS

AB JP 03139284 A UPAB: 19930928

DNA fragment contains gene that gives at least macrolide antibiotic resistance and has base sequence 5'-CGCAGTACT-3' 5'-GGCGCCCTG-3'. Vector retains DNA fragment (1). Transformant retains vector DNA (2) that is exogenous to host.

DNA fragment (1) contains base sequence 5'-CGCAGTACT-3' between restriction enzyme sites SmaI-ScaI, and base sequence 5'-GGCGCCCTG-3' between restriction enzyme sites NarI-SalI. In DNA fragment (1), base sequence between SmaI-ScaI is CCCGGCCGGCGC GGCGTCTCGGA CACCTGGGCCG GTTGCCGCT GGCCGATGCCTA CGGTC GCAGTACT and between NarI-SalI is GGCGCCCTGC TCGTGGTGA CACCGACCGCCG AACACCTGGTC GAGCTGGTGGGA CCGGCTGGGGC TGCTGCGGGTCGAC. Macrolide antibiotic resistance giving gene is that gives mycinamicin resistance. Most is Actinomycetes pref. Streptomyces sp. esp. Stl lividans TK-24/pMCM4 (FERM P-10783).

USE/ADVANTAGE - By cloning macrolide antibiotic resistance gene of this invention on vector plasmid, and by insertion gene to other bacteria with the cloning vector system, the gene of this invention can be used for cloning of other gene fragment by using macrolide antibiotic resistance as a marker, selection of transformant. Further, by transformation of various kinds of Actinomycetes with the gene, it can be used for screening of new antibiotic effective to macrolide antibiotic resistant bacteria, etc.

0/0

⑪ 公開特許公報 (A)

平3-139284

⑫ Int. Cl.⁵C 12 N 15/65
1/21
15/76

識別記号

ZNA

府内整理番号

6807-4B

⑬ 公開 平成3年(1991)6月13日

※

審査請求 未請求 請求項の数 10 (全13頁)

⑭ 発明の名称 マクロライド抗生物質耐性を付与する新規遺伝子

⑮ 特願 平2-137997

⑯ 出願 平2(1990)5月28日

優先権主張 ⑰ 平1(1989)7月11日 ⑲ 日本 (JP) ⑳ 特願 平1-178490

㉑ 発明者 井上 雅晴 静岡県田方郡大仁町三福632-1

㉒ 発明者 鈴木 康司 静岡県田方郡大仁町三福632-1

㉓ 発明者 諸星 俊郎 静岡県田方郡大仁町三福525-1

㉔ 発明者 武藤 直紀 静岡県田方郡修善寺町熊坂1077-38

㉕ 発明者 堀之内 末治 千葉県千葉市弥生町1-170 西千葉宿舎2-406

㉖ 発明者 別府 輝彦 東京都杉並区堀之内1-5-21

㉗ 出願人 東洋醸造株式会社 静岡県田方郡大仁町三福632番地の1

最終頁に続く

明細書

1. 発明の名称

マクロライド抗生物質耐性を付与する新規遺伝子

2. 特許請求の範囲

(1) 少なくともマクロライド抗生物質耐性を付与し、5'-CCCACTACT-3'、5'-GGCCGCCCTG-3' の塩基配列を有することを特徴とする遺伝子を含むDNA断片。

(2) 5'-CCCACTACT-3' の塩基配列を制限酵素サイト Sma I - Sca I の間に含み、5'-GGCCGCCCTG-3' の塩基配列を制限酵素サイト Nar I - Sal I の間に含むことを特徴とする請求項第1項記載のDNA断片。

(3) 制限酵素サイト Sma I - Sca I の間の塩基配列が、

CCCCGGGGCGCCGGCCCGTCTGGCACACCTGGGGCCGGTTGGCG

CTGGCCCGATGCCACGGTCCACTACT、および制限酵素サイト Nar I - Sal I の間の塩基配列が、

GGCCGCCCTGCTCGTGGTGACACCGAACGGACACACCTGGTCGA

GCTGGGTGGACCGGCCTGGGGCTGCTGGGGTCCACである請求項第2項記載のDNA断片。

(4) マクロライド抗生物質耐性を付与する遺伝子が、マイシナミシン耐性を付与する遺伝子である請求項第1項記載のDNA断片。

(5) 請求項第1項記載のDNA断片を保持することを特徴とするベクター。

(6) 宿主にとって外來性である請求項第5項記載のベクターDNAを保持することを特徴とする形質転換体。

(7) 宿主が放線菌に属する微生物である請求項第6項記載の形質転換体。

(8) 放線菌がストレプトマイセス属に属する微生物である請求項第7項記載の形質転換体。

(9) ストレプトマイセス属に属する微生物がストレプトマイセス・リビダンスに属する微生物である請求項第8項記載の形質転換体。

(10) ストレプトマイセス・リビダンスに属する微生物が、ストレプトマイセス・リビダンス (Streptomyces lividans) TK-24/pMCM4

微生物受託番号：微工研菌寄第10783号、F
ERM P-10783」である請求項第9項記載の形質転換体。

3. 発明の詳細な説明

<産業上の利用分野>

本発明は、少なくともマクロライド抗生物質耐性、特にマイシナミシン耐性を付与する新規な遺伝子を含むDNA断片、該DNA断片を保持するベクター、および該ベクターを保持する形質転換体に関する。

<従来の技術および発明が解決しようとする問題点>

マイシナミシンはミクロモノスボラ グリゼオリビダ A11725 菌株の生産する抗生物質であり、マイシナミシンI、マイシナミシンII（一般名：ミボラマイシン）、マイシナミシンIII、マイシナミシンIVおよびマイシナミシンVとして示される、16員環の環状ラクトンおよび2個の糖残基からなるマクロライド抗生物質であり（"Journal of Antibiotics" Vol.33 No.4, p.364-376, 1980）。

マイシナミシンについては、その生産菌の自己耐性遺伝子は未だ報告されていなかった。

<問題点を解決するための手段>

本発明者は上記問題点を解決すべく鋭意研究したところ、マイシナミシンの生産菌であるミクロモノスボラ グリゼオルビダのゲノムDNAから、エリスロマイシン、タイロシンの自己耐性遺伝子とは全く異なる、少なくともマクロライド抗生物質耐性を付与する遺伝子を含むことを特徴とする新規なマイシナミシンの自己耐性遺伝子DNA断片をクローニングし、該遺伝子DNA断片をベクターに保持せしめ、該ベクターを宿主である放線菌、例えばストレプトマイセス属に属する微生物に保持せしめて形質転換体を得、培養することにより、マイシナミシン耐性をはじめとして他のマクロライド抗生物質耐性をも発現せしめることが可能であることを見出した。

また、このマクロライド抗生物質自己耐性遺伝子をベクタープラスミド上にクローニングすることにより、このクローニングベクター系を用いて

作用機構として細菌のリポソームに結合し蛋白質合成阻害をひき起こすことにより、グラム陽性の菌種をはじめ、マイコプラズマ等に強い抗菌活性を示す抗生物質である。

マクロライド抗生物質生産菌については、従来からその物質の合成遺伝子の解明が進められている。特に、タイロシン、エリスロマイシンの2つの抗生物質生産菌については、それらの自己耐性遺伝子が分離されている。タイロシンについてはtirA ("International Symposium of Biology in Actinomycetes'88"抄録 p.365-370), tirB (特開昭62-294087号公報), tirC (特開昭63-36788号公報) の3つの独立した自己耐性遺伝子が同定されており、tirBの近傍には合成遺伝子群の存在が報告されている（特開昭62-294087号公報）。エリスロマイシンについては1つの自己耐性遺伝子が同定されており、その近傍に合成遺伝子群の存在が報告されている ("Gene 38(1985)p.103-10")。

しかし、同系統のマクロライド抗生物質である

他の菌種に遺伝子移入させ、マクロライド抗生物質耐性を指標にした他の遺伝子断片のクローニング、またはマクロライド抗生物質耐性を指標にした形質転換体の選択にも利用でき、さらにこのマクロライド抗生物質自己耐性遺伝子を用いて種々の放線菌に形質転換させることにより、マクロライド抗生物質耐性菌に対して効果を示す新規抗生物質のスクリーニングにも応用でき、そしてさらにこのマクロライド抗生物質自己耐性遺伝子の塩基配列を利用し合成プローブを作製することにより、マクロライド抗生物質の生産菌のDNAをハイブリダイゼイション法により同定することを可能にする等、既知物質の収量の増大、ならびに新規抗生物質および抗生物質導体の開発を目的とする多くの有用な用途があることを見出した。

即ち本発明は、少なくともマクロライド抗生物質耐性を付与し、5'-CGCACTACT-3'、5'-GGCGCCC TG-3' の塩基配列を有することを特徴とする遺伝子を含むDNA断片、

該DNA断片を保持することを特徴とするベク

ター、

宿主にとって外来性である該ベクターDNAを保持することを特徴とする形質転換体、を提供する。

本発明のDNAは、例えば遺伝子組換え技術を利用し次の如くして製造される。

例示すれば、マイシナミン產生能を有し、マイシナミン耐性遺伝子の供与体である微生物より該微生物のゲノムDNAを分離精製した後、ショットガン法で制限酵素等により部分消化した該DNAと、切断してリニヤーにした発現ベクターとを両DNAの平滑または接着末端部においてDNAリガーゼ等により結合閉環させる。次いで得られた組換えDNAベクターのマーカーおよび/またはマイシナミン耐性とを指標としてスクリーニングして取得した該組換えDNAベクターを保持する微生物を培養し、該培養菌体から該組換えDNAベクターを分離精製し、ついで該組換えDNAベクターからマイシナミン耐性を付与する本発明DNAを採取することにより製造できる。

レアーゼ処理、アルコール沈殿、遠心分離等の方法を適宜組み合わせることにより行うことができる。

分離精製された微生物DNAを切断する方法は、例えば、超音波処理、制限酵素処理等により行うことができるが、得られるDNA断片とベクターとの結合を容易ならしめるため、ショットガン法により、例えば、BamH I, Nco I, Pst I, Sph I等の制限酵素で部分消化すればよく、好ましくはBamH IまたはPst Iで行うのが適している。

ベクターとしては、宿主微生物体内で自律的に増殖しうるファージまたはプラスミドから遺伝子組換え用として構築されたものが適している。

ファージとしては、例えば、ストレプトマイセス・リビダンスを宿主微生物とする場合には、φC31等が使用でき、エシエリヒア・コリを宿主微生物とする場合には、λgt・λC, λgt・λB等が使用できる。

また、プラスミドとしては、例えば、ストレプトマイセス・リビダンスを宿主微生物とする場合

DNAの供与微生物は、マイシナミン產生能を有し、マイシナミン耐性遺伝子を供与する微生物であればよく、好ましくはミクロモノスボラ属に属するミクロモノスボラ グリゼオルビダ A 11725 (FERM BP-705) が挙げられる。

遺伝子の供与体である微生物由来するDNAは次のようにして採取される。例えば、液体培地で約1~3日間通気搅拌培養し、得られる培養物を遠心分離して集団し、次いでこれを溶菌させることによってマイシナミン耐性遺伝子を含有する溶菌物を調整する。溶菌方法としては、例えばリゾチームやアクロモペプチダーゼ等の細胞壁溶解酵素による処理が施され、必要によりプロテアーゼ等の他の酵素やラウリル硫酸ナトリウム等の界面活性剤が併用され、さらに細胞壁の物理的破壊法である凍結融解やフレンチプレス処理を上述の溶菌法との組み合わせで行ってもよい。このようにして得られた溶菌物からDNAを分離・精製するには、常法に従って、例えばフェノール抽出による除蛋白処理、プロテアーゼ処理、リボスク

にはpIJ41, pIJ922, pIJ702, pIJ680, pIJ364 等が使用でき、好ましくはpIJ41, pIJ702である。またエシエリヒア・コリを宿主微生物とする場合には、pUC118, pBR322, pBR325, pACYC184, pUC12, pUC13, pUC18, pUC19 等が使用でき、好ましくはpUC118である。さらに、ストレプトマイセス・リビダンスおよびエシエリヒア・コリ等の2種以上の宿主微生物の細胞中で自律的に増殖可能なシャトルベクターを利用してすることもできる。このようなベクターを、先に述べたマイシナミン耐性遺伝子供与体である微生物DNAの切断に使用した制限酵素と同じ制限酵素で切断して、ベクター断片を得ることが好ましい。

微生物DNA断片とベクター断片とを結合させる方法は、公知のDNAリガーゼを用いる方法であればよく、例えば、微生物DNA断片の接着末端とベクター断片の接着末端とのアニーリングの後、適当なDNAリガーゼの作用により微生物DNAとベクター断片との組換えDNAを作製する。必要ならば、アニーリングの後、宿主微生物に

移入して、生体内のDNAリガーゼを利用し組換えDNAを作成することもできる。

宿主微生物としては、組換えDNAが安定かつ自律的に増殖可能で、かつ外来性のDNAの形質が発現できるものであればよく、例えば、宿主微生物が放線菌に属するストレプトマイセス・リビダンスの場合、ストレプトマイセス・リビダンスTK-24、ストレプトマイセス・リビダンスTK-23、ストレプトマイセス・リビダンス1326、ストレプトマイセス・リビダンスTK-21（以上、英國ジョン・イネス研究所より入手可能である）等が使用でき、特にストレプトマイセス・リビダンスTK-24を用いるのが好ましい。また宿主微生物がエシェリヒア・コリの場合、エシェリヒア・コリMV1304、エシェリヒア・コリDH1、エシェリヒア・コリHB101、エシェリヒア・コリW3110、エシェリヒア・コリC600等が使用でき、特にエシェリヒア・コリMV1304を用いるのが好ましい。

宿主微生物に組換えDNAを移入する方法としては、例えば、宿主微生物がストレプトマイセス

属に属する微生物の場合には、ポリエチレングリコールの存在下で移入を行い、またエシェリヒア属に属する微生物の場合には、カルシウムイオンの存在下で組換えDNAの移入を行えばよい。

宿主微生物への目的組換えDNA移入の有無についての選択は、目的DNA断片を保持する組換えDNAであるベクターのマーカー、好ましくは薬剤耐性マーカーおよび／またはマイシナミシン耐性を発現し得る微生物を検索すればよく、例えば、薬剤耐性マーカーに基づく選択培地で生育すればよい。

このようにして一度選択されたマイシナミシン耐性遺伝子を保有する組換えDNAは、形質転換微生物から取り出され、他の宿主微生物に移入することもできる。また、マイシナミシン耐性遺伝子を保持する組換えDNAから制限酵素等により切断してマイシナミシン耐性遺伝子であるDNAを切り出し、これと同様な方法により切断して得られる他の閉環ベクター末端とを結合させて、新規な特徴を有する組換えDNAを作成して、他の

宿主微生物に移入することもできる。

斯くて得られる形質転換体を具体的に例示すれば、ミクロモノスボラ グリゼオルビダ A11725（FERM BP-705）より採取したマイシナミシン耐性をコードする遺伝子を含むDNAをプラスミドpIJ41に組み込み、該プラスミドpMCM4を宿主微生物に移入して得た形質転換体ストレプトマイセス・リビダンス TK-24/pMCM4株「微工研菌寄第10783号（FERM P-10783）」が挙げられる。

かくして得られる本発明DNAの塩基配列は、Science 214 1205～1210（1981年）に示されているジデオキシ法で解読し決定することができる。

例えば、マイシナミシン耐性遺伝子供与体としてミクロモノスボラ グリゼオルビダに属する菌を用い、宿主微生物としてエシェリヒア・コリを用いて得られたプラスミド中の遺伝子の塩基配列としては、少なくとも5'-CCGACTACT-3'、5'-GGCGCCCTG-3'の塩基配列を含むことを特徴としており、また5'-CCGACTACT-3'の塩基配列を制限酵素

サイトSma I-Sca Iの間に含み、5'-GGCGCCCTG-3'の塩基配列を制限酵素サイトNar I-Sal Iの間に含む特徴を有している。

さらに付加的に特徴を挙げるに当たり、制限酵素サイトSma I-Sca Iの間の塩基配列および制限酵素サイトNar I-Sal Iの間の塩基配列はそれぞれ次の通りである。

(Sma I-Sca I)

CCGGGGCCGGCGCGGCCGCTGGCACACCTGGGGCCGGTTGCCG
CTGGCCGATGCCAACGGTCCGAGTACT

(Nar I-Sal I)

GGCGCCCTGCTCGTGTGACACCGAACCGCCGAACACCTGGTCGA
GCTGGTGACCGGCTGGGCTGCTGGGGTCGAC

また、第3-i図および第3-ii図にて示される本発明の制限酵素サイトNco I-Sph I間のDNA断片の塩基配列を基に、例えば第1図の制限酵素地図にて示される適宜な制限酵素を1種または2種以上用いて水性媒体、好ましくは緩衝液中で加水分解せしめる等の周知の技術によってその小断片塩基配列を得ることができる。このよう

して得られる本発明の少なくともマクロライド抗生物質耐性を付与するDNAの特徴部分を有する小断片塩基配列は、10～数10の塩基数またはそれ以上のものがよく、さらにその相補配列のものでもよく、これらの小断片は、同一または類似のDNAのプローブとして利用できる有用性を有するものである。

次いで形質転換体である微生物の培養形態はその栄養生理的性質を考慮して培養条件を選択すれば良く、通常多くの場合は、液体培養で行うか、工業的には深部通気搅拌培養を行うのが有利である。培地の栄養源としては、微生物の培養に通常用いられるものが広く使用され得る。炭素源としては、質化可能な炭素化合物であればよく、例えばグルコース、サッカロース、ラクトース、マルトース、フラクトース、糖蜜等が使用される。窒素源としては利用可能な窒素化合物であれば良く、例えばペプトン、肉エキス、酵母エキス、カゼイン加水分解物等が使用される。その他、リン酸塩、炭酸塩、硫酸塩、マグネシウム、カルシウム

、カリウム、鉄、マンガン、亜鉛等の塩類、特定のアミノ酸、特定のビタミン等が必要に応じて使用される。

培養温度は微生物が発育し、マイシナミシン耐性を発現し得る範囲で適宜変更し得るが、ストレプトマイセス・リビダンスの場合、好ましくは28～30℃程度である。培養時間は、条件によって多少異なるが、マイシナミシン耐性の発現が現れる時期を見計らって適当な時期に培養を終了すればよく、通常48～72時間程度である。培地pHは菌が発育し、マイシナミシン耐性を発現し得る範囲で適宜変更し得るが、特に好ましくはpH 7.0～7.5程度である。

かくして得られる形質転換体の培養物中からマイシナミシン耐性を付与する遺伝子をもつプラスミドpMCM4を分離・精製し、このプラスミドpMCM4を用いて種々の目的に使用することができる。例えば、このマクロライド抗生物質自己耐性遺伝子を含むDNA断片をベクタープラスミド上にクローニングすることにより、このクローニングベ

クター系を用いて他の菌種に遺伝子移入させ、マクロライド抗生物質耐性を指標にした他の遺伝子断片のクローニング、またはマクロライド抗生物質耐性を指標にした形質転換体の選択にも利用でき、さらにこのマクロライド抗生物質自己耐性遺伝子を用いて種々の放線菌に形質転換させることにより、マクロライド抗生物質耐性菌に対して効果を示す新規抗生物質のスクリーニングにも応用できる。またさらにこのマクロライド抗生物質自己耐性遺伝子の塩基配列を利用し合成プローブを作製することにより、マクロライド抗生物質の生産菌のDNAをハイブリダイゼイション法により同定することも可能である。

<実施例>

以下実施例を挙げて本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらによって何ら限定されるものではない。

実施例1

(ミクロモノスボラ グリゼオルビグ A11725 由来ゲノムDNAの調製)

ミクロモノスボラ グリゼオルビグ A11725 (FERM BP-705) の凍結乾燥菌を150mlの三角コルベンを用いてシード培地30ml(可溶性デンプン2g、イーストエキストラクト0.5g、N.2アミン0.5g、トリプトケース0.5g、炭酸カルシウム0.1g、硫酸第一鉄2mg、10N NaOH 20μl、水100ml、pH: 7.2)で28℃にて48時間培養した。

その後、本培養物を種母とし、500mlの三角コルベンを用いて100mlの培養液(可溶性デンプン2.5g、ポリペプトン0.8g、イーストエキストラクト0.2g、カザミノ酸0.1g、硫酸第一鉄2mg、硫酸マグネシウム50mg、水90ml、1/10M pH7.0リン酸緩衝液10ml)に接種菌体量5%になるように接種し、96時間培養した。

培養菌体を、4℃・6,500rpmにて20分間遠心分離し、沈渣を0.3Mサッカロース50mlにて洗浄した。その後、再び4℃・6,500rpmにて20分間遠心分離し、TES緩衝液(50mM pH8.0トリス塩酸緩衝液(シグマ社製)、35mM Na₂EDTA、25%サッカ

ロース) 20mlにて懸濁し、最終濃度が各々リゾチーム2 mg/ml、アクロモベブチダーゼ(和光純薬社製)1 mg/mlになるように添加して、37℃にて3時間反応させた。その後、10×SDS(Sodium Dodecyl Sulfate)を0.5ml添加後、37℃にて5分間放置し、クロロホルム-フェノール21mlを加えて攪拌した。この溶液を、20℃・10,000rpmにて3分間遠心分離し、上層を100mlのビーカーにとり、エタノール42mlを静かに流し入れた。更にこの液を、滅菌した細いガラス棒でかきませながらクロモゾームDNAを巻き取り、標品であるミクロモノスボラ グリゼオルビダ A11725のゲノムDNAを得た。

実施例2

(プラスミドpIJ41の単離)

(1). ストレプトマイセス・リビダンス TK-24/pIJ41の培養

ストレプトマイセス・リビダンスTK-24/pIJ41胞子約10⁸個を、チオストレプトン2 μg/mlを含有するTSB(トリプトケースソイプロース、

Difco 社製)10mlに接種し、培養が初期定常期に達するまで28℃で増殖させた。次いでこの5mlを使用してチオストレプトン2 μg/mlを含有するTSB培地100mlへ接種し、48時間培養を行った。

(2). プラスミドの単離

上記の培養菌体を集め、0.3Mサッカロース溶液で1回洗浄した。次いでリゾチーム溶液(50mMトリス塩酸緩衝液, 35mM Na₂EDTA, 25% サッカロース、リゾチーム 最終濃度1 mg/ml)30mlを添加した。この溶液を30℃で60分間インキュベートし、次いで10N NaOH 500 μl, 10% SDS 2.5ml, H₂O 9.5mlからなる溶液12mlを加え混合した。これを0℃にて10分間放置後、5M酢酸カリウム緩衝液(5M 酢酸カリウム20ml, 酢酸3.8ml, H₂O9.5ml)を加えて混合した。再び0℃にて10分間放置後、4℃・30,000rpmにて40分間超遠心分離を行った。上清を集め、等量のクロロホルム-フェノール液(10mMトリス塩酸緩衝液およびpH8.0Na₂EDTA1mMで飽和したフェノール500mlとクロロ

ホルム500mlの混合液)を加えてよく混合した。6,500rpm・室温にて30分間遠心分離後、上清約45mlを滅菌したビンに移した。次いで冷エタノール90mlを加えて、-110℃にて20分間放置し、4℃・6,500rpmにて30分間遠心分離を行った。沈査へ7mlのTE(10mMトリス塩酸緩衝液, 1mM Na₂EDTA)を加え、更に2 mg/mlのRNase A(シグマ社製)溶液を添加して、37℃にて20分間インキュベートした。次いで8mlのTE-フェノール液を加え、充分に混合後、10,000rpm・室温にて10分間遠心分離を行った。上層をバスクールビペットでとり、1.6mlの冷エタノールを加え、-110℃にて20分間放置後、10,000rpm・4℃にて10分間遠心分離し、沈査を減圧乾燥させ、TE 1.9mlを加えDNAを溶かした。そこへ塩化セシウム20g, 奥化エチジウム10mg/mlの溶液2mlを加えて攪拌した。この溶液を超遠心チューブに移し、20℃・50,000rpmにて16時間遠心分離した。その後、プラスミドバンドが含まれている部分を紫外線照射しながら無菌化された注射

器で取り出した。その画分をTE緩衝液およびイソプロパノールで5~6回抽出し、奥化エチジウムを除去した。次いで透析チューブに移し、TEを透析液として一夜透析した。この操作でプラスミドpIJ41のDNA約100 μgが得られ、これを1 μg/mlの濃度でTE緩衝液に浮遊し、4℃で貯蔵した。

実施例3

(プラスミドpMCM4の組み立て)

実施例1で得られたミクロモノスボラ グリゼオルビダのゲノムDNA約5 μgを制限酵素BamH I(10mM pH8.0 トリス塩酸緩衝液, 7mM MgCl₂, 100mM NaCl, 2mM メルカブトエタノール, 0.01%ウシ血清アルブミン)で部分消化した。この消化した遺伝子を以下の方法にてプラスミドpIJ41のBamH Iサイトへクローニングを行った。

まず、プラスミドpIJ41を10mMトリス塩酸緩衝液, 7mM pH8.0 塩化マグネシウム, 100mM 塩化ナトリウム, 2mM-メルカブトエタノール, 0.01%ウシ血清アルブミンを含む反応液にて制限酵素BamH

Iで完全消化した後、バクテリアアルカリフェヌルファターゼ（東洋紡績社製）を0.5単位加え、65℃にて1時間反応させた。その後、クロロホルム-メチルエーテル液で2回処理し、水層に1/10溶3M酢酸ナトリウムおよび2倍容のエタノールを加え、遠心分離してプラスミド断片を回収した。次に、上記のBamH Iで部分消化したミクロモノスボラグリゼオルヒドDNA断片（4～15Kbp）を、上記のプラスミドpIJ41のBamH Iサイトにライゲーションキット（宝酒造社製）を用いて連結させた。以上の操作で得られた組換えプラスミドをストレプトマイセス・リビダンスTK-24に導入し形質転換した。

胞子が着生するまで再生させた後、マイシナミシンⅡ400μg/ml及びチオストレプトン30μg/mlを含むトリプトカースイアガード（TSA, Difco社製）培地にレブリカし、マイシナミシン耐性株を得た。この耐性株よりプラスミドを調製したところ、すべてのプラスミドはBamH Iで切り出される約5KbpのDNA断片が含まれており、これら

のプラスミドは再形質転換によりストレプトマイセス・リビダンスTK-24にマイシナミシン耐性を付与した。

こうして得られた約5KbpのDNA断片をBamH I, Sph Iで完全消化することによりサブクローニングを行い、得られた約2.8KbpのDNA断片を低融点アガロースゲルから回収した（「ラボマニアル遺伝子工学」村松正実編（丸善御発行）P.20-28）。得られた約2.8Kbpの制限酵素BamH I-Sph I間のDNA断片の制限酵素地図を第1図に示した。

一方、プラスミドpIJ41をBamH I, Sph Iで完全消化した後、50mM pH8.0トリス塩酸緩衝液中にバクテリアアルカリフェヌルファターゼ（東洋紡績社製）を0.5単位加え、65℃にて1時間反応させた。その後クロロホルム-メチルエーテル液で2回処理し、水層に1/10溶3M酢酸ナトリウムおよび2倍容のエタノールを加え、遠心分離して、プラスミドを回収した。

次いで、上記低融点アガロースゲルから回収し

た約2.8Kbpの挿入断片と、上記BamH I, Sph Iで完全消化したプラスミドpIJ41を、ライゲーションキット（宝酒造社製）を用いて連結させた。こうして得られた組換えプラスミドをプラスミドpMCM4と命名し、このプラスミドpMCM4の制限酵素地図を第2図に示した。

実施例4

〔ストレプトマイセス・リビダンスTK-24への形質転換〕

ストレプトマイセス・リビダンスTK-24をトリプトカースイアガード（TSA, Difco社製）10mlに胞子約10⁶個を加えて初期定常期に達するまで28℃で増殖させた。次いでこの5mlを使用し、TSA培地100mlへ接種し、48時間培養を行った。その後、4℃・6,500rpmにて20分間の冷却遠心分離後、沈渣を0.3Mサッカロース50mlで洗浄し、リゾチームが1mg/mlになるように高張リン酸緩衝液（25mMトリスメチル2-アミノエタンスルホン酸、25mM CaCl₂、0.05%KH₂PO₄、サッカロース103g, K₂SO₄ 0.25g, MgCl₂·6H₂O 2.02g, Tris-HCl 100ml）に懸濁し、2.4×10⁶ cells/mlのプロトプラスト溶液を得た。

ace Element Solution 2ml, H₂O 800ml) 4mlに懸濁し、30℃にて100分反応させた。

* Trace Element Solutionの組成

ZnCl ₂	4.0 mg
FeCl ₃ ·6H ₂ O	2.00 mg
CuCl ₂ ·2H ₂ O	1.0 mg
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1.0 mg
Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O	1.0 mg
(NH ₄) ₂ MoO ₄ ·4H ₂ O	1.0 mg

その後、この菌懸濁液を滅菌したガラスウールで濾過し、ガラスウール通過液を1,300rpmにて5分間遠心分離した。その上清を再びガラスウール濾過した後、2,800rpmにて10分間の遠心分離を行い、その沈渣からプロトプラスト細胞を得た。この沈渣を上記の高張リン酸緩衝液500μlに懸濁し、2.4×10⁶ cells/mlのプロトプラスト溶液を得た。

このプロトプラスト溶液を50μl分取し、実施例3で得たプラスミドpMCM4 10μlと混合させ、滅菌した2.5%ポリエチレングリコール液（

分子量1,000) 500 μ lを加えて室温に2分間放置した。さらに2分後、高張リン酸緩衝液500 μ lを加えて混合し、これを希釈し、再生培地であるMR0.3 S培地(2%可溶性デンプン、0.75%ミート、0.5%ポリペプトン、0.1%炭酸カルシウム、硫酸第一鉄4mg、0.5%塩化マグネシウム、10.3%サッカロース、*Trace Element Solution 1ml、寒天2.2g、pH:7.2)に0.6%寒天を含むリン酸緩衝液(P-ソフト寒天)とともに重層した。

24時間後にチオストレプトン(最終濃度2 μ g/ml)、マイシナミシンⅡ(最終濃度100 μ g/ml)を含むP-ソフト寒天を再び重層し、30°Cにて5日間培養した。得られた形質転換体をチオストレプトン2 μ g/ml、マイシナミシンⅡ100 μ g/mlを含むTSB培地5mlで、28°Cにて2日間培養し、この培養液1mlを遠心分離により集菌した。このようにして得た形質転換体をストレプトマイセス・リビダンス(*Streptomyces lividans*)TK-24/pMCM4(微研菌寄10783号(FERM P-10783))として工業技術

院微生物工学技術研究所に寄託した。

次いで、上記の集菌した沈査に2mg/mlリゾチームを含む50mM pH8.0トリス塩酸緩衝液、35mM pH8.0 Na₂EDTA、25%サッカロース0.2mlを加え、37°Cで60分間反応させた後、25%SDSを含む0.4N NaOH 100 μ lを加え混合した。次いでこれを0°Cにて5分間放置した後、酢酸カリウム液(5M酢酸カリウム600 μ l、酢酸115 μ l、水285 μ l)150 μ lを加え、0°Cにて5分間放置した。その後、15,000rpmにて5分間遠心分離した後、上清に等量のクロロホルム-フェノールを加えて処理し、水層をエーテルで2回処理してから2倍容のエタノールを加え、-70°Cで20分間放置した。その後、15,000rpmにて15分間遠心分離して、沈査を回収し、75%エタノールで洗浄後、減圧乾燥し、沈査を5 μ g/ml RNase Aを含む水に溶き、BamHI-SphIで完全消化して挿入断片を含むクローンを選別した。

実施例5

(制限酵素サイトNco I-EcoRIサイト間塩基

の薬剤耐性付与の実験)

実施例3で得られたプラスミドpMCM4を用いて、制限酵素EcoRIで37°Cにて1時間完全消化した後、65°Cにて30分間処理した。その後、T4 DNAポリメラーゼにより突出末端をうめて平滑末端とし、その後制限酵素Nco Iで37°Cにて1時間完全消化した。これをクロロホルム-フェノール液で2回処理し、水層に1/10溶3M酢酸ナトリウムおよび2倍容エタノールを加えて遠心分離後、約0.9KbpのDNA断片を低融点アガロースゲルから回収して得た。一方、プラスミドpIJ702をEcoRV、Nco Iで完全消化した後、50mM pH8.0トリス塩酸緩衝液中にバクテリアアルカリフィオスマターゼ(東洋紡績社製)を0.5単位加え、65°Cにて1時間反応させ、その後クロロホルム-フェノール処理を2回行い、水層に1/10溶3M酢酸ナトリウムおよび2倍容のエタノールを加えて遠心分離し、EcoRV、Nco Iで完全消化したプラスミドpIJ702を回収した。

次に、上記低融点アガロースゲルから回収して

得た約0.9Kbp DNA断片と、上記EcoRV、Nco Iで完全消化したpIJ702をライゲーションキット(宝酒造社製)を用いて連結させた。こうして得られた組換えプラスミドをストレプトマイセス・リビダンスTK-24に形質転換させ、この形質転換体のマクロライド抗生物質に対する薬剤耐性度を調べた結果、薬剤耐性値は宿主であるストレプトマイセス・リビダンスTK-24と変わらず、マクロライド抗生物質耐性発現は起こっていなかった。

同様にして制限酵素サイトSau 3A I-EcoRI間塩基の薬剤耐性付与の実験をした結果、マクロライド抗生物質耐性発現は起こっていなかった。

実施例6

(制限酵素サイトEcoRI-Sph I間塩基の薬剤耐性付与の実験)

実施例5と同様にして、実施例3で得られたプラスミドpMCM4を用いて、制限酵素EcoRIで37°Cにて1時間完全消化した後、65°Cにて30分間処理した。その後、T4 DNAポリメラーゼにより突出末端をうめて平滑末端とし、その後制限酵

素Sph Iで37℃にて1時間完全消化した。これをクロロホルム-フェノール液で2回処理し、水層に1/10溶3M酢酸ナトリウムおよび2倍容エタノールを加えて遠心分離後、約1.0KbpのDNA断片を低融点アガロースゲルから回収して得た。一方、プラスミドpIJ702をEcoRV, Sph Iで完全消化した後、50mM pH8.0トリス塩酸緩衝液中にバクテリアアルカリフェヌスファターゼ（東洋紡績社製）を0.5単位加え、65℃にて1時間反応させ、その後クロロホルム-フェノール処理を2回行い、水層に1/10溶3M酢酸ナトリウムおよび2倍容のエタノールを加えて遠心分離し、EcoRV, Sph Iで完全消化したプラスミドpIJ702を回収した。

次に、上記低融点アガロースゲルから回収して得た約1.0KbpのDNA断片と、上記EcoRV, Sph Iで完全消化したpIJ702をライゲーションキット（宝酒造社製）を用いて連結させた。こうして得られた組換体プラスミドをストレプトマイセス・リビダンスTK-24に形質転換させ、この形質転換体のマクロライド抗生物質に対する薬剤耐性度を調

た。クロロホルム-フェノール液で2回処理した後、水層に1/10溶3M酢酸ナトリウムおよび2倍容のエタノールを加え、遠心分離してプラスミドを回収した。

上記ゲルから回収した挿入断片と上記BamH I, Sph Iで消化したプラスミドpUC118をライゲーションキットを用いて連結させた。100mlの半培地（1Lにつき、バクトリップトン20g、バクトイーストエキストラクト5g, MgSO₄, pH: 7.6）で培養した対数増殖期のエシェリヒア・コリMV1304を集菌し、40mlの氷冷緩衝液（30mM酢酸カリウム, 100mM RbCl, 10mM CaCl₂, 50mM MnCl₂, 15% グリセリン, pH: 5.8）で懸濁し、0℃にて5分間放置した後遠心集菌し、さらに4mlの10mM OPS緩衝液（ドータイト社製）（5mM CaCl₂, 10mM RbCl, 15% グリセリン, pH: 6.5）に懸濁し、0℃で15分間放置して、コンピテント細胞とした。このエシェリヒア・コリ懸濁液200μlにライゲーションしたDNA溶液20μlを加え、0℃にて30分間放置した。その後、42℃にて9

べた結果、薬剤耐性値は宿主であるストレプトマイセス・リビダンスTK-24と変わらず、耐性発現は起こっていなかった。

同様にして制限酵素サイトEcoR I-Pvu II間塩基の薬剤耐性付与の実験をした結果、マクロライド抗生物質耐性発現は起こっていなかった。

実施例7

（塩基配列の決定）

(1) プラスミドpUC118への組換え、およびエシェリヒア・コリへの形質転換

実施例3で得られた約2.8KbpのBamH I-Sph I制限断片を以下の通りベクターpUC118のBamH I-Sph I部位にクローニングし、エシェリヒア・コリMV1304に形質転換した。

まず、pIJ41をBamH I, Sph Iで完全消化して得られた約2.8Kbpの挿入断片を低融点アガロースから回収した。また、プラスミドpUC118をBamH I, Sph Iで完全消化した後、50mM pH8.0トリス塩酸緩衝液中にバクテリアアルカリフェヌスファターゼ0.5単位を加え、65℃にて1時間反応させ

0秒間熱処理し、LB培地800μlを加え、31℃にて90分間インキュベートした。この内の300μlをアンピシリン50μg/ml, 0.02% X-gal (5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-ガラクトシド) および50μM IPTG (イソプロビル-β-D-チオ-ガラクトピラノシド) を含むLB培地寒天プレートにまき、一晩培養して形質転換体を得た。

形質転換した単一の白いコロニーを2mlのLB培地で一晩培養し、遠心分離により集菌した。これに1mg/mlリゾチームを含む50mM pH8.0トリス-塩酸、50mM pH8.0 Na₂EDTA、15% サッカロースからなる液0.6mlを加え、37℃にて15分間反応させた後、10%SDS 12μlを加え混ぜ合わせた後、5M 酢酸カリウム60μlを加え、0℃で30分間放置した。その後、10,000rpmにて15分間遠心分離後、上清に等量のクロロホルム-フェノールを加えて処理し、水層をエーテル処理し、2倍容のエタノールを加え、-70℃にて15分間放置した。その後、15,000rpmにて15分間遠心分離して沈渣を回収し、75% エタノールで2回洗浄後、

減圧乾燥した。沈査を5 μg/ml RNase Aを含む水に溶き、BamH I, Sph Iで消化し、挿入断片を含むクローンを選別した。

(2). 塩基配列の決定

こうして得られたクローンを含む單一コロニーを6 mlのLB培地にて37℃で一晩培養後、その内の5 mlを500mlのLB培地に植菌し、37℃で培養した。対数増殖期の菌液に150 μg/mlのクロラムフェニコールを加え、さらに一晩培養した。6,000rpmにて10分間の遠心分離により集菌し、10% サッカロース20ml, 25mM Na₂EDTA, 50mM pH8.0トリス塩酸にリゾチームを最終濃度20mg/mlとなるように加え、37℃にて10分間反応後、10% DS2mlを加え、37℃にて2分間処理した。14.000rpmにて30分間遠心分離後、上清に等量のクロロホルム-フェノールを加えて処理し、水層に1/10容の3M酢酸ナトリウムと2倍容のエタノールを加えて、-70℃にて15分間放置した。3,000rpmにて15分間遠心分離後、回収した沈査に21mlのトリス-塩酸(pH7.4)を加えて溶解し、塩化

セシウム20g および臭化エチジウム1mlを加え、4℃・50,000rpmにて一晩遠心分離した。その後、閉環状プラスミドDNAを分取し、臭化エチジウムを除くためイソプロパノールで5回抽出した。その後、透析により塩化セシウムを除き、2倍容のエタノールを加えて、-70℃にて15分間放置した。3,000rpmにて30分間遠心分離し、沈査を75% エタノールで2回洗浄後、減圧乾燥し、濃度を約1 μg/μlになるように調製した。

得られたプラスミドから、約2.2Kbpである制限酵素サイトNco I-Sph Iの間に領域にわたり正負両鎖の一本鎖DNAを調製し、M13を用いたジデオキシ法(Science, 214, 1205-1210(1981))を用いて塩基配列を解析し、第3-i図および第3-ii図の通り決定した。その結果、本発明の遺伝子DNAは少なくとも制限酵素EcoR IサイトCAATTGを中流域に有し、その上流域に少なくとも5'-CGGAGTACT-3'の塩基配列を含み、下流域に5'-GGGGCCCTG-3'の塩基配列を含むことを特徴しており、5'-CGGAGTACT-3'の塩基配列を制限酵素サ

イトSma I-Sca Iの間に含み、5'-GGGGCCCTG-3'の塩基配列を制限酵素サイトNar I-Sal Iの間に含む特徴を有していた。

また、制限酵素サイトSma I-Sca Iの間の塩基配列および制限酵素サイトNar I-Sal Iの間の塩基配列の特徴はそれぞれ次の通りであった。

(Sma I-Sca I)

CCCCGGCCGGCGCGGGCGTCTGCCACACCTGGGGCGGTGGCCGCTGGCCGATGCCACGGTCCGAGTACT

(Nar I-Sal I)

GGCGCCCTGCTCGTGGTGACACCGACCCCCGAACACCTGGCTCGACCTGGCTCGAC

尚、本発明の遺伝子DNAのオープンリーディングフレームは第4図の通りであった。

実験例7

(ミクロモノスボラ グリゼオルビダ A11725、ストレプトマイセス・リビダンス TK-24、形質転換体ストレプトマイセス・リビダンス TK-24/pMC

M4の各薬剤耐性度検査)

供与微生物であるミクロモノスボラ グリゼオ

ルビダ A11725、宿主細胞であるストレプトマイセス・リビダンスTK-24 および実施例4で得られた形質転換体ストレプトマイセス・リビダンス TK-24/pMC M4の各種マクロライド剤に対する薬剤耐性度を検討した。

トリプトケースソイアガー(TSA, Difco社製)を20mlシャーレに入れ、マクロライド抗生物質であるマイシナミシンⅡ(マイシナミシンの一部成分)、ジオサマイシン、エリスロマイシン、チオストレプトンを10 μg/ml~500 μg/mlまでの濃度を変え、培地を作製した。

このシャーレにミクロモノスボラ グリゼオルビダ A11725、ストレプトマイセス・リビダンス TK-24および-70℃凍結保存菌であるストレプトマイセス・リビダンス TK-24/pMC M4を一白金耳塗布し、28℃にて48時間培養を行い、菌の増殖が抑制された最小の濃度をそれぞれ耐性度とし、第1表に示した。

(以下余白)

第1表 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)

Drug Strain	マイクナミシンⅡ	グリタマイシン	エリスロマイシン
ミクロモニス球菌 グリセロル ヒテ A11725	50	20	2
ストレプトマイセス・リビダン ス TK-24	250	20	2
ストレプトマイセス・リビダン ス TK-24/pMCM4	≥ 500	200	30

<発明の効果>

本発明のマクロライド抗生物質耐性遺伝子は、このマクロライド抗生物質自己耐性遺伝子をベクター・プラスミド上にクローニングすることにより、このクローニングベクター系を用いて他の菌種に遺伝子移入させ、マクロライド抗生物質耐性を指標にした他の遺伝子断片のクローニング、またはマクロライド耐性を指標にした形質転換体の選択にも利用でき、さらにこのマクロライド抗生物質自己耐性遺伝子を用いて種々の放線菌に形質転換させることにより、マクロライド抗生物質耐性菌に対して効果を示す新規抗生物質のスクリーニングにも応用でき、そしてさらにこのマクロライ

D抗生物質自己耐性遺伝子の塩基配列を利用して合成プローブを作製することにより、マクロライド抗生物質の生産菌のDNAをハイブリダイゼーション法により同定することを可能にする等、既知物質の収量の増大、ならびに新規抗生物質および抗生物質誘導体の開発を目的とする多くの有用な用途を提供する。

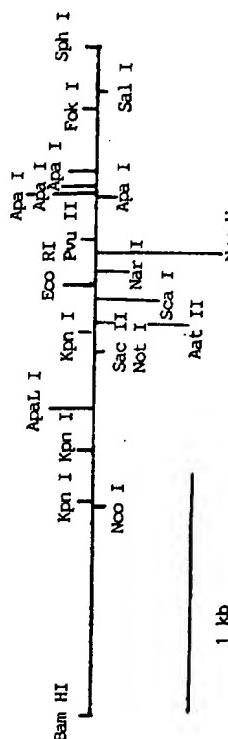
4. 図面の簡単な説明

第1図は、制限酵素BamH I - Sph I間のDNA断片の制限酵素地図を示す。第2図は、プラスミドpMCM4の理化学的性質を示す。第3-i図および第3-ii図は、制限酵素Nco I - Sph I間の塩基配列を示す。第4図は、オープンリーディングフレームを示す。

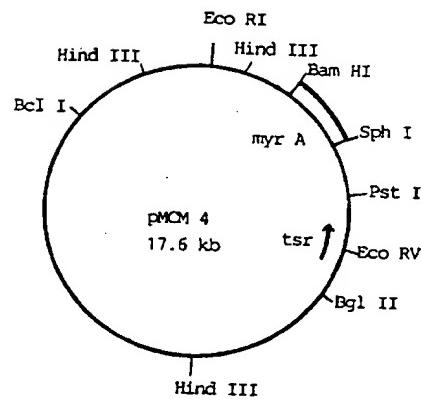
特許出願人

東洋醸造株式会社

第1図



第2図



第 3-i 図

10 20 30 40 50 60
 CCATGGTGTG AACCGGGTAC CGCCGGCGAC GAAAGCACCC GTGCCGTCCA CGGGCTCGAT
 70 80 90 100 110 120
 GATCCAGACC GGCAGCCGCC CGCCGAGGCC AGCCAGCAGC GCCGGGTCCG GGGCGACGCC
 130 140 150 160 170 180
 CTCCCTCGCCG ACGGGCGTGG AGCCCCGGAG CAGCCGAACC AGGTCTCTCG TGAGTAGCTG
 190 200 210 220 230 240
 CTCGGTCAGC GTGTCGGCGA CGGTCAACAG GTCGCCGGGG GCCTTCTCCC CGACGCTGGC
 250 260 270 280 290 300
 CTCGGTCAGC CGGGGTACCG GGGTCATCAC CACCTCGTCC AGCATCGGCC TGACCAAAGT
 310 320 330 340 350 360
 ACCCACTGGG GTGAACCCGG CGAGATCCAG CATCGTCCGA TGTAGGGGT CGGCTCCCG
 370 380 390 400 410 420
 TCCGGCTGAC CGCGCAGCG CGGCCGGCG ATGCCCTGG CTGACCGGGT GCACCCCGAC
 430 440 450 460 470 480
 CTGCTCCCCC ACCTCCCTG CCGGGCTGC GCGCAGCCCG TGACCCAGGC CGACCGGCCA
 490 500 510 520 530 540
 CCACCAACGG CGCTGCCCTG CCGGGGGGGG CACAGCTTCC AGATCGGCC ACAGGGGTAC
 550 560 570 580 590 600
 GTCAACCTGC TCACGGGCCG CGCACCGCAC GTCGGCAGAC CGGGCCAGAT GATCGCCCG
 610 620 630 640 650 660
 AGGGAGGAGT TTCTGGCCG CGGGCACTAC GACCCGTTCT CGGGGGACT CGCCACCCCG
 670 680 690 700 710 720
 GCGGGCCGGG CGGTGCCACG TCGTCTCCGG CCCGGCAGG GCGTGGGGCA ACCGGTGGCG
 730 740 750 760 770 780
 TACCGGATC TCGTGGTGGA CGGGGGAGCC GGTACCGGGC GGCACCTCCC CGCACTGCTC
 790 800 810 820 830 840
 GACCGGGTGC CGACCCGGT CGGGCTGGCG CTGGACCTCT CGAAGCCCCC ACTACGGGG
 850 860 870 880 890 900
 GCGGGCCGGG CGCATCCCCG GCGGGGGCGG GCGTCTCG ACACCTGGGG CCGGTTGGCG
 910 920 930 940 950 960
 CTGGCCGATG CCACGGTCCG AGTACTGGTC AACGTCTTCC CGCCGGCGAA CGGGCGGGAA

970 980 990 1000 1010 1020
 TTCCGTGGGG TGCTCCGGCC GGACGGGCC CTGCTCGTGG TGACACCGAC CGCCGAAACAC
 1030 1040 1050 1060 1070 1080
 CTGGTCAGGC TGGTGGACCG GCTGGGGCTG CTGCGGGCTG ACCCGGCCAA GGACGGCCCG
 1090 1100 1110 1120 1130 1140
 GTGGCCGACA GCCTCACCGAG ACACCTCGAA CGGGCGGGCC AGAGCACCCA CGGGCACCGG
 1150 1160 1170 1180 1190 1200
 CTCAGCTGA CGGGGAAGGA GGTGAGTACCG CTGGTGGTA TGGGGGGAG CGCCTGGCAC
 1210 1220 1230 1240 1250 1260
 ACCGACCCGG CGGGGCTCAC CGGGCGGGTC GCAGGCGCTGT CGGAGGGGTG CACGGTCACC
 1270 1280 1290 1300 1310 1320
 GCGGCTGTCC CGCTGCCCG TTACCGGGCG ATCTGACCCG CGGGCCCCCG ACCGGGCCCG
 1330 1340 1350 1360 1370 1380
 CCCGGGTCGG CGGGCCCCGGT TCGGGGGGCC CGGCTTCGGC GGGCCCCGGT CGGGGGGCC
 1390 1400 1410 1420 1430 1440
 GTTCGGCGG GCCACGGCGG CCACCGAGGC ACCGGGCCCG GTAGGGGAC AGACGGCCG
 1450 1460 1470 1480 1490 1500
 GCGGGGGTGT CTGGGGTCTA CGGTGGAGGG TCGACCTCTT CCCAACCCGG
 1510 1520 1530 1540 1550 1560
 GGGGGGTCA TCGTACGGG CGGGCAGCAC CACGGCCAC TCCAGGCC ACCGGGCTG
 1570 1580 1590 1600 1610 1620
 GCGGATGGCG TCGGAGTCTA TGACCCGGG CAGGGGCAGG CGCTCCCGT CCGACTCCAG
 1630 1640 1650 1660 1670 1680
 GTACGGCCAG CGTACGGCAGT AGTCGAGGTC GAGCAGGGG CGCGCTGGC GGGGTGCTGG
 1690 1700 1710 1720 1730 1740
 GGGGGACGA CGAGGGGGCC CGGGCATCCG TCGAAGGTCT CCCGGCCAC GATGTTGGC
 1750 1760 1770 1780 1790 1800
 ACCTTCGCA CGAGGTCTC GTCGACCCGC AGGGACGGGT CGAGCTGCTT GGTCAGGCC
 1810 1820 1830 1840 1850 1860
 AGCACCCAGG TCACTGGCA GAGGGCGTCC TGGTCCAGCA CGAACGACAG GTOGTCGCC
 1870 1880 1890 1900 1910 1920
 TTGCGGGCGG TGATGAAGTC CCACTCCGGC GGGGTGACCG AGTCCACCA CGGGGAGCCG
 1930 1940 1950
 ACCAGCCAGG CGATCCCCCG CTGGTGGCCG ATGC

第 4 図

10 20 30 40 50 60
 ATGATGGCG CGAGGGAGGA GTTCTGGCC GCGGGGCACT ACGACCCGT CTGGGGCGA
 70 80 90 100 110 120
 CTCGCCACCG CGGGGGGGCG GGGGGTCCA CGTCGTGTC GGCGGGCGA CGGGGTGGCG
 130 140 150 160 170 180
 GAACCGGTG CGTACCCCGA TCTGGTGGT GACGGGGAG CGGGTACCGG CGGGCACCTC
 190 200 210 220 230 240
 GCGGCAGTGC TCGACGGGT GCGGACGCC GTGCCCTGG CGCTGGACGT CTGGAAGGCC
 250 260 270 280 290 300
 GCACTACGGC GGGGGGGCG GGGCGATCCC CGGGGGGGCG CGGGCTCTG CGACACCTG
 310 320 330 340 350 360
 GGGCGGGTGC CGCTGGCGA TGCCACGGTC GCAGTACTTG TCAACGTCTT CGCCCCGGCG
 370 380 390 400 410 420
 AACGGGGCCG AATTCCCTCG GGTGCTCCGG CGCGACGGCG CCCTGCTCGT GGTGACACCC
 430 440 450 460 470 480
 ACCGGCCAGC ACCTGGTGA CGTGGTGAC CGGCTGGGG TGCTGGGGT CGACCCGGCC
 490 500 510 520 530 540
 AAGGACGGCC CGGTGGCGA CAGCCTCAC AGACACTTCG AACGGGGGG GCAGAGCAC
 550 560 570 580 590 600
 CACCGGGACC GGCTTCAGCT GACCCGGAA GAGGTGCTGA CCCTGGTTGG TATGGGGCCG
 610 620 630 640 650 660
 AGCGGCTGGC ACACGGACCC GGCGGGCTC ACCGCGCGG TCGCAGCCCT GTCCGAGCCG
 670 680 690 700
 GTCACGGTCA CGGGGGCTGT CGGGCTGGCC CGTACCGCC CGATCT

第1頁の続き

⑤Int. Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

//(C 12 N 15/65
C 12 R 1:29)
(C 12 N 1/21
C 12 R 1:465)
(C 12 N 15/76
C 12 R 1:465)